

**SZOMATOSZTATIN ÉS PACAP HATÁSAINAK VIZSGÁLATA  
GYULLADÁS, FÁJDALOM ÉS TRIGEMINOVASZKULÁRIS  
AKTIVÁCIÓ MODELLJEIBEN**

**EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS**



**Dr. Markovics Adrienn**

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Neurofarmakológia Program**

**Programvezető: Dr. Pintér Erika**

**Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna**

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET**

2012

## ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

### A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és hármaskörű funkciója

A kapszaicin-érzékeny, azaz a kapszaicin specifikus Transzients Receptor Potenciál Vanillod 1 (TRPV1) receptorát expresszáló érző neuronok **hármaskörű funkcióval** rendelkeznek: afferens, valamint lokális és szisztémás efferens működéseket közvetítenek. A **klasszikus afferens működés** során a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, ennek következtében alakul ki a nocicepció, melynek szubjektív megélése a fájdalom. Emellett az aktivált perifériás idegvégződésből neurotranszmitterek szabadulnak fel (kalcitonin gén-rokon peptid/CGRP, P-anyag/SP, neurokinin A/NKA), amelyek vazodilatációt és plazmafehérje kiáramlást okoznak. Ez adja a **lokális efferens funkciót**, aminek következtében kialakul a neurogén gyulladás. Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégződésekből szomatosztatin (SST) is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez a harmadik, **szisztémás efferens funkció**, amit a szomatosztatin endokrin és parakrin hatásainak mintájára Szolcsányi professzor szenzokrin működésnek nevezett el.

### A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló szenzoros neuropeptid

Az aktivált kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló **gyulladáskeltő hatású neuropeptid** egyik csoportját a tachikininek alkotják. Ide sorolható a SP, valamint az NKA és NKB. Hatásaikat három G-proteinhez kapcsolt tachikinin receptoron keresztül fejtik ki. A SP érpermeabilitás-fokozódást és plazmafehérje-extravázációt vált ki, stimulálja a limfociták proliferációját, citokinek termelését, a hízósejtek aktivációját, a T-sejtek kemotaxisát, valamint a neutrofil granulociták akkumulációját. Az NKA a SP-hez hasonlóan erőteljes plazmafehérje-kiáramlást idéz elő, továbbá simaizom-kontrakciót vált ki és stimulálja a gyulladásos sejteket. Az NKB-t kötő NK3 receptor főként a központi idegrendszerben található, de jelen van a perifériás idegvégződéseken is. A CGRP erős vazodilatátor hatással rendelkezik, amely elsősorban a CGRP1 receptoron keresztül valósul meg. Érpermeabilitást fokozó hatását a SP hatásának potenciózásával fejtik ki.

**Fájdalom- és gyulladásgátló hatású neuropeptid** a szomatosztatin és a PACAP, melyek bemutatására a tézis későbbi részében kerül sor. Ide tartoznak még az opioid peptid is, melyek gátolják az immunsejtek proliferációját, a kemotaxist, a szuperoxid- és citokintermelést, valamint a hízósejtek degranulációját.

### Nocicepció, hiperalgézia, allodínia, fájdalom

A Nemzetközi Fájdalom Társaság meghatározása szerint a fájdalom olyan pszichofiziológiai jelenség, szubjektív érzéskvalitás, amelynek két jól definiálható komponense van. Neurobiológiai eleme a **nocicepció** (a fájdalmas stimulus percepciója, szenzoros tapasztalat), ami állatkísérletesen is vizsgálható, míg az affektív komponens (a **fájdalom** emocionális megélése) megítélésére csak emberi vizsgálatok alkalmasak. A különféle állatkísérletes modellekben vizsgálható nocicepció mechanikai (érintés, nyomás), termális (hideg vagy meleg hőmérséklet) vagy kémiai (kapszaicin, formalin, ecetsav, stb.) ingerek hatására keletkezik, és a nocifenzív (fájdalomelhárító) reakciók küszöbértéke vagy latenciája mérhető.

Az alapvetően nem fájdalmas stimulus hatására kialakuló érzékenység-fokozódást **allodíniának**, míg az enyhe fájdalmat kiváltó inger hatására fokozódó fájdalomérzetet **hiperalgéziának** nevezzük.

# 1. A SZOMATOSZTATIN SST<sub>4</sub> RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AKUT ÉS KRÓNIKUS FÁJDALOMMODELLEKBEN

## IRODALMI HÁTTÉR, ELŐZMÉNYEK

### Az ízületi gyulladás komplex patofiziológiai mechanizmusai, a neurogén gyulladásos komponens és a neuro-immun interakciók szerepe

A neurogén gyulladás jelentős szerepet játszik számos betegség, mint pl. az asztma, a pszoriázis, az ekcéma, a kontakt dermatitisz, a gyulladásos bél- és szembetegségek, valamint a reumatoid artritisznek (RA) a patomechanizmusában. Az ízületi tok és a szinovium gazdag szenzoros innervácót kap. Ezek az idegvégződések a feszülést és a fájdalmat közvetítik, a belőlük felszabaduló SP, NKA és CGRP magukon az idegvégződéseken, az ereken, a szinoviális sejteken valamint az ízületi gyulladásos sejteken fejtik ki biológiai hatásaikat, melyek révén jelentősen hozzájárulnak a gyulladásos reakció és a következményes fájdalom, hiperalgémia kialakulásához.

Az RA egy autoimmun háttérű, krónikus, progresszív sokízületi gyulladás, mely az ízületek destrukciója és deformitása révén a betegek fájdalmát, mozgáskorlátozottságát, rokkantságát és életminőségük jelentős romlását idézi elő. A kórkép terápiájában a korai, erélyes bázisterápia jelenti a legnagyobb esélyt a páciensek számára. Ezen szerekek hatástalansága esetén alkalmazhatunk biológiai szereket, melyek a betegség kialakulásában szerepet játszó egy-egy folyamatba célzottan avatkoznak be, elsősorban a gyulladásos citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) hatását befolyásolva. Napjainkban nincs forgalomban egyetlen olyan gyógyszer csoport sem, amely hatékonyan tudná gátolni a gyulladásos betegségek neurogén komponensét.

### A neuropátiás fájdalom, mechanizmusai és kísérletes vizsgálata

A neuropátiák fogalma alatt általában a környéki idegrendszer legkülönbözőbb eredetű károsodását, és az ebből következő funkcióvesztést, fájdalmat és egyéb panaszokat értjük, melyek egyes speciális formákat kivéve más szervi betegségek következményei.

A neuropátia háttérében három különböző patofiziológiai folyamat állhat. Ezek egyike a **Waller-féle degeneráció**, amikor az adott ideg neurális (axon, mielin) és egyéb elemei (epi, peri, és endoneurium) egyszerre károsodnak. A funkció visszatérésére ilyenkor kevés esély van, ha mégis megtörténik, akkor abban egy másik ideg vagy gyök részéről létrejövő kollaterális ingerületátvitel („*ephaptic crosstalk*” ill. axonális „*sprouting*”) játszik szerepet. Ez utóbbi mechanizmus azonban a hibás összeköttetések révén a panaszok, diszesztéziák egyik fő forrása is. **Primer demielinizáció** esetében a lézió elsődlegesen a mielint érinti, az axonális struktúrák kezdetben épek, viszont a szaltatorikus ingerületvezetés megszűntével a vezetési sebesség lassulása, súlyos esetben vezetési blokk következik be. Legritkább és egyben legrosszabb prognózisú az úgynevezett **axonális neuropátia**, amikor priméren az axon károsodik.

A perifériás neuropátiás fájdalom állatkísérletes vizsgálatára gyakran alkalmazzák az ún. **Seltzer-műtétet**. Zeev Seltzer 1990-es közleménye a *részleges szoros n. ischiadicus lekötésével* kiváltott neuropátiás fájdalommodellről fontos mérföldkövet jelentett. A modell előnyei, hogy bár spontán fájdalommal jár, öncsonkító magatartás mégsem figyelhető meg, továbbá a végtag nem válik érzéketlenné, így kiváltott válaszok is vizsgálhatóak a von Frey és a Randall Selitto módszerekkel. Mivel a leköttött ideg kevert, ezért szenzoros, motoros és vegetatív rostok változó mértékben és arányban károsodnak, azonban a 7. napon, amikor mi is végezzük méréseinket, motoros koordinációs zavar nem figyelhető meg (nem publikált saját eredményeink). A modell további fontos előnyei, hogy technikailag egyszerű, gyors, kis műtéti traumával jár, jól ismételtető, megbízható, és a kialakuló mechanikai hiperalgémia/ allodínia jól vizsgálható.

### **A szomatosztatin és receptorai, szerepük a gyulladásban és a nocicepcióban**

A **szomatosztatin**, vagy más néven szomatotropin felszabadulást gátló faktor (SRIF; SST) 14, illetve 28 aminosavból álló ciklikus peptid formában a szervezet számos helyén megtalálható. Jelen van a központi és a perifériás idegrendszerben, a GI traktus neuroendokrin sejtjeiben, a hasnyálmirigyben, a vesében, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, gyulladásosejtjeiben, ivarszervekben. Az ízületekben az aktivált szinovialis sejtek és az immunsejtek is szekretálnak szomatosztatint, amely autokrin vagy parakrin módon fejt ki hatását. A szomatosztatin gátló hatást gyakorol számos hormon szekréciójára, a gasztrointesztinális motilitásra és az emésztőnedvek termelésére. Gátolja a tumorsejtek proliferációját, valamint erős immunmodulátor hatással rendelkezik. Csökkenti a B-limfociták IgA, IgM és IgE szekrécióját, gátolja a T-limfociták IL-2, IL-4, IL-10 és interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) termelését, a neutrofil granulociták kemotaxisát, a makrofágok fagocitát, és a természetes ölüsejtek killer aktivitását. A szomatosztatinnak a központi idegrendszerben neuromodulátor szerepe van, gátolja más neurotranszmitterek (glutamát, szerotonin, acetyl-kolin) és neurohormonok (GHRH) felszabadulását. Befolyásolja a lokomotoros aktivitást és a kognitív funkciókat, jelentőségét számos pszichiátriai és neurológiai kórképben igazolták.

Az SST az idegelemek közül elsősorban a kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronokban szintetizálódik és tárolódik. Állatkísérletes modellekben és különböző fájdalomkórképekben kimutatták, hogy a kívülről beadott szomatosztatin csökkenti a fájdalmat. A SST szerkeázó hatásait saját receptorai közvetítik. Eddig öt G<sub>i</sub>-proteinhez kapcsolt SST receptort klónoztak egérben, patkányban, illetve emberben, amelyeket sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub>, sst<sub>4</sub> és sst<sub>5</sub> névvel illették. Ez az öt sst receptor két csoportra osztható. A SRIF1 csoportba tartoznak az sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptorok, míg a SRIF2 csoportba sorolják az sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorokat. Munkacsoportunk eredményei azt mutatják, hogy a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás a SRIF2 csoporthoz köthető a periférián. Bár e receptorok klónozása elősegítette az SST fiziológiai/patofiziológiai szerepével kapcsolatos kutatásokat, különösen nagy előrelépést a receptor génhányos egerek előállítása jelentett.

Bár a natív SST terápiás alkalmazását rendkívül széles hatásspektruma és nagyon rövid plazma eliminációs féleletideje akadályozza, a stabil, szelektív sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> agonisták azonban új terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban.

### **A szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptoron ható szelektív agonisták**

A stabil, a szenzoros idegvégződésekre és számos gyulladásosejt sst<sub>4</sub> receptorain szelektíven ható szintetikus agonisták nagy előnye, hogy nem rendelkeznek az SST sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptorai által közvetített endokrin hatásokkal.

Sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> receptor agonista molekula a ciklikus heptapeptid szerkezetű TT-232, amelynek széleskörű antinociceptív hatását számos korábbi kísérletünk igazolta.

Jelen kísérleteinket egy sst<sub>4</sub> receptorhoz szelektíven, nagy affinitással kötődő SST agonistával, a J-2156 kódjelű vegyülettel végeztük, amit a Juvantia Pharma (Turku, Finnország) gyárában szintetizáltak. A J-2156 nem-peptid, szulfonamido-peptidomimetikum, pontos kémiai szerkezete (1'S, 2S)-4-amino-N-(1'-karbamoil-2'-feniletil)-2-(4''-metil-1''-naftalénszulfonamino)-butánamid. A J-2156 nanomólos affinitással kötődik az emberi sst<sub>4</sub> receptorhoz, ami a natív SST kötődési affinitását jelentősen meghaladja, valamint közel 400-szoros szelektivitást mutat az sst<sub>4</sub>-hez az emberben megtalálható másik négy SST receptorhoz viszonyítva.

## CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám egyik célja az volt, hogy megvizsgáljam a szomatosztatin  $sst_4$  receptor szerepét akut és krónikus ízületi gyulladási folyamatokban, valamint neuropátiás mechanikai hiperalgéziában, génihiányos egerek és a szelektív  $sst_4$  receptor agonista peptidomimetikum J-2156 segítségével. Arra kerestük a választ, hogy az  $sst_4$  receptor jelenthet-e új terápiás célpontot a gyulladási folyamatok és a fájdalom kezelésében.

## KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

### Kísérleti állatok

Heterozigóta  $sst_4^{+/-}$  egereket tenyésztettünk intézetünk állatházában, melyeket Dr. Piers Emson C57Bl/6 törzsből állított elő. Vizsgálatainkhoz az első három generációból származó, 20-25 g-os, hím  $sst_4^{-/-}$  és  $sst_4^{+/+}$  egereket használtuk. Az állatokat 24-25°C-on tartottuk, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva. Egyes kísérletsorozatokban azonban az összehasonlítás céljából  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  alomtestvéreket is teszteltünk.

### Kísérleti modellek:

#### **- Carrageenannel kiváltott akut gyulladás**

Ebben a kísérleti elrendezésben  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egereket és alomtársaikat hasonlítottuk össze. Az állatok egyik talpába 50  $\mu$ l 3%-os carrageenan-oldatot injektáltunk, amellyel kevert típusú, neurogén és nem-neurogén komponensekből álló gyulladási reakciót idéztünk elő lokálisan. A carrageenan-adás előtt 10 perccel az állatok egy másik csoportját 100  $\mu$ g/kg J-2156-tal kezeltük intraperitoneálisan (i.p.), míg kontrollként csak oldószert (fiz.sóoldat) alkalmaztunk.

#### **- Freund-adjuvánsal kiváltott krónikus ízületi gyulladás**

A krónikus ízületi gyulladást komplett Freund-adjuváns (CFA; 1 mg/ml hővel előlt *Mycobacterium tuberculosis* paraffinolajos szuszpenziója) faroktőbe, valamint i.p. történő adásával (50-50  $\mu$ l) váltottuk ki az egerekben. A szisztémás hatás fokozása érdekében a faroktőbe történő CFA-adást a következő napon megismételtük, ezt a napot tekintjük a kísérlet első napjának.

#### **-A *n. ischiadicus* részleges lekötésével kiváltott traumás mononeuropátia**

$Sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egereket elaltattunk, az egyik oldali *n. ischiadicust* a combon kipreparáltuk, majd az ideg 1/3-1/2-ed részét szorosan leköttük. A műtétet követően az állatokat 7 napig hagytuk felépülni. Miután az állatok mechanonociceptív küszöbét meghatároztuk, és a kialakult fájdalomküszöb-csökkenésről meggyőződünk, mindkét állatcsoportot 100  $\mu$ g/kg  $sst_4$  agonistával (J-2156) kezeltük i.p., majd 30 perc elteltével újabb mérést végeztünk.

### Vizsgálati módszerek:

#### **-A talp érintési érzékenységek mérése**

A talp érintési érzékenységét dinamikus plantáris eszteziométerrel vizsgáltuk. Ez egy módosított, digitalizált von Frey készülék, amellyel az állat talpának középső részét egy tompa hegyű tüvel fokozódó erőhatásnak tudjuk kitenni. A fájdalomküszöb elérésekor az állat elrántja a lábát a tűről és a számláló leáll, az erőhatás pedig a műszer kijelzőjéről grammban leolvasható. A mért adatokat a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítottuk, a gyulladás hatására kialakuló hiperalgéziát százalékban fejeztük ki.

#### **-A lábtérfogat mérése**

A lábtérfogat mérésére az erre kifejlesztett pletizmometert alkalmaztuk, amely a közlekedőedények elve alapján a láb bemelegítésekor bekövetkező folyadéktérfogat-kiszorítást érzékeli  $cm^3$ -ben.

#### **-A spontán súlyeloszlás meghatározása**

A hátsó végtagi súlyeloszlás méréséhez incapacitance tesztet használtunk, mely a spontán fájdalom megítélésére alkalmas. Az állatokat a speciális plexiketreben helyeztük el úgy, hogy testsúlyukkal hátsó végtagjaikra nehezedtek, melyeket a vizsgálat során egy-egy mérleggel ellátott lapon

tartottak. A spontán fájdalom hatására megváltozott súlyeloszlást a végtagok értékeinek egymáshoz való viszonyításával, százalékban fejeztük ki.

**-A gyulladós citokinek meghatározása ELISA és Cytometric Bead Array (CBA) módszerekkel**

### **1. A homogenizált ízületek IL-1 $\beta$ koncentrációjának meghatározása szendvics ELISA módszerrel**

A homogenizátumok IL-1 $\beta$  koncentrációját mouse IL-1 $\beta$  OptEIA szettel határoztuk meg. A mért értékekből a citokin-koncentrációértékeket pg citokin/g ízület mértékegységben adtuk meg.

### **2. A homogenizált ízületek TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$ koncentrációjának meghatározása CBA módszerrel**

A fenti citokinek vizsgálatához a Mouse Th1/Th2 cytokine CBA kitet használtuk. A citokinek koncentrációját a detektáló antitest gerjesztése által kiváltott fluoreszcencia intenzitása alapján flow citométerrel határoztuk meg.

## **EREDMÉNYEK**

### **Az sst<sub>4</sub> receptor szerepe carrageenannel kiváltott akut gyulladásban**

Az sst<sub>4</sub><sup>+/+</sup> és sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> állatcsoport kontroll mechanonociceptív küszöbértékei és lábtérfogatai lényegesen nem különböztek egymástól. A carrageenan a kezelt végtag jelentős gyulladást okozta duzzadással, pírrel és a mechanonociceptív küszöb csökkenésével. A gyulladás kiváltása után 6 órával a lábduzzadás és a nociceptív küszöb csökkenése is szignifikánsan nagyobbak voltak az sst<sub>4</sub> génhiányos csoportban. A vad típusú és a heterozigóta állatokból keresztezéssel tenyésztett sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> alomtestvérek eredményei nem különböztek lényegesen a külön vonalakként tenyésztett sst<sub>4</sub><sup>+/+</sup> és sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> állatcsoportok eredményeitől. A szelektív sst<sub>4</sub> receptor agonista J-2156-tal történt előkezelés szignifikánsan csökkentette a mechanikai hiperalgéziát a vad állatcsoportban, de a génhiányos csoportban nem. A J-2156 egyik csoportban sem mérsékelte a lábduzzadást.

### **Az sst<sub>4</sub> receptor szerepe Freund-adjuvánssal kiváltott krónikus ízületi gyulladásban**

A mechanikai hiperalgézia nagyobb volt a sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> állatcsoportban, mint a vad típusúakban, bár szignifikáns különbséget a 21 napos periódus alatt 4 mérési pontban tapasztaltunk. A kísérlet első 12 napjában az sst<sub>4</sub> génhiányos egerek szignifikánsan kisebb mértékben terhelték a kezelt lábukat, mint a vad típusú kontrolljaik. Szignifikáns eltérést a lábduzzadásban csak a 4. és 6. napon tapasztaltunk, a térfogatnövekedés a későbbiekben mindkét csoportban kb. 80-100% volt.

A kísérlet végén kimetszett és feldolgozott ízületi mintákban az IL-2, -4 és -5 mennyisége elhanyagolhatóan mutatkozott mindkét állatcsoportban. Figyelemre méltó volt azonban az IFN $\gamma$  mennyiségének alakulása: bár összmennyiségét tekintve szintén igen keveset találtunk belőle, a receptor génhiányos állatcsoportban még így is szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen. Jelentős mennyiséget csak TNF $\alpha$ -ból és IL-1 $\beta$ -ből mértünk. A TNF $\alpha$  koncentrációja szignifikánsan nagyobb volt az sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> egerek ízületében. Legnagyobb mennyiségben IL-1 $\beta$ -t találtunk a mintáinkban, azonban ebből a citokinből mindkét csoportban közel azonos koncentrációkat mértünk.

### **Az sst<sub>4</sub> receptor szerepe traumás mononeuropátiában**

A Seltzer-műtétet követő 7. napon kialakult a traumás mononeuropátia, amelynek következtében 31-34% mechanikai hiperalgézia jött létre mind a vad típusú, mind a receptor génhiányos egerekben. Ez a hiperalgézia a 12. posztoperatív napra változatlanul fennmaradt a vad típusú egerekben, míg kis mértékben, 24%-ra módosult az sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> csoportban. Ebben a modellben a J-2156 hatástalannak bizonyult mindkét állatcsoportban, mindkét mérési időpontban.

## MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Szomatosztatin  $sst_4$  receptor génhiányos egerekkel végzett kísérleteink eredményei elsőként szolgáltatottak közvetlen bizonyítékokat arra, hogy e receptor mind akut, mind krónikus gyulladásos folyamatokban protektív szereppel rendelkezik. Szomatosztatin exogén alkalmazása, valamint szintetikus agonisták (a TT-232 és a J-2156) csökkentik a neurogén vazodilatációt, plazma protein extravazációt és a gyulladáskeltő neuropeptidok (SP és CGRP) felszabadulását az idegvégződésekből.

Jelen kísérleteink során mindkét gyulladásmodellben szignifikánsan nagyobb mértékű mechanikai hiperalgéziát, azaz fájdalomküszöb-csökkenést, valamint az akut modellben szignifikánsan nagyobb lábduzzadást tapasztaltunk az  $sst_4^{-/-}$  állatok csoportjában, elsősorban a gyulladásos folyamatok korábbi stádiumaiban. A krónikus artritisz modellben továbbá a gyulladt végtag terhelés-csökkenése, és az ízületi homogenizátumban az  $IFN\gamma$  és  $TNF\alpha$  koncentrációja ugyancsak szignifikánsan nagyobb volt az  $sst_4$  receptor hiánya esetén. A krónikus kísérlet első hetében az  $sst_4$  receptor endogén aktivációjának szignifikáns analgetikus és duzzadásgátló szerep tulajdonítható, ami a későbbi fázisban már nem figyelhető meg. Ennek magyarázatául szolgálhat az az elképzelés, hogy az immunsejtekből felszabaduló egyéb mediátorok a szomatosztatin e gátló hatásait hosszabb idő alatt ellensúlyozzák. Az  $sst_4$  receptor exogén aktivációjának jelentős gyulladásgátló és antinociceptív hatásait bizonyítja, hogy a nem peptid szerkezetű szelektív agonista J-2156 kezelés gátolta az akut gyulladásos reakció során kialakuló mechanonociceptív küszöbcsökkenést. A gyulladásmodellekben tapasztalt eredményekkel ellentétben a traumás mononeuropátia okozta mechanikai hiperalgéziát sem az  $sst_4$  receptor genetikai hiánya, sem a J-2156 kezeléssel történő exogén aktivációja nem befolyásolta szignifikánsan. Ez az eredmény abból a szempontból meglepő, hogy patkány ugyanilyen traumás mononeuropátia modelljében ez a vegyület anti-hiperalgetikus hatásúnak bizonyult. Ezen ellentmondás magyarázatául szolgálhatnak esetleges faji különbségek a patkány és az egér között a neuropátia kialakulási mechanizmusainak, az  $sst_4$  receptor lokalizációjának/sűrűségének, valamint a J-2156 kinetikai paramétereinek vonatkozásában. A J-2156-tal végzett korábbi kísérletekben ez az agonista hatékonyan gátolt különböző gyulladásos folyamatokat is patkányban, egyrészt a neurogén komponensért felelős SP és CGRP szenzoros idegvégződésekből történő felszabadulásának csökkentésén, másrészt közvetlenül az ereken és az immunsejteken kifejtett gátló hatásokon keresztül. E peptidfelszabadulást gátló mechanizmust izolált tracheán korábban egyértelműen bizonyították. Mivel a J-2156 szelektíven csak az  $sst_4$  receptoron fejti ki hatását, nem rendelkezik a natív szomatosztatinra jellemző széleskörű endokrin hatásokkal, mint a növekedési hormon, a glukagon, az inzulin felszabadulásának gátlása, ezek ugyanis főként az  $sst_2$ ,  $sst_3$  és  $sst_5$  receptor altípusokhoz (SRIF1 receptorcsalád) kapcsolhatók. Mindezek alapján a J-2156 előreláthatóan kedvező mellékhatás spektruma gyógyszerfejlesztés szempontjából is kiemelt jelentőséggel bír.

Bár az  $sst_4$  receptor pontos lokalizációjára vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, ezen agonistával nyert funkcionális adatok alapján valószínű, hogy e gátló hatások magukon az érzőidegvégződéseken, valamint az érfali endotélsejteken és a gyulladásos sejteken lévő  $sst_4$  receptor-aktiváción keresztül valósulnak meg. Ez utóbbira direkt *in vitro* bizonyítékot is szolgáltatottak a peritoneális makrofágok  $IL-1\beta$ -termelésének gátlásával.

## **2. A SZOMATOSZTATIN ÉS KORTISZTATIN HATÁSAINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA GYULLADÁS- ÉS FÁJDALOMMODELLEKBEN**

### **ELŐZMÉNYEK, IRODALMI HÁTTÉR**

#### **A kortisztatin és szerepe a nocicepcióban és gyulladásoz folyamatokban**

A kortisztatin (CST) szerkezetileg az SST-hez nagyon közel álló neuropeptid, mely nevét túlnyomóan agykérgi expressziójáról és neuronális aktivitást gátló hatásáról kapta. A CST-nek is különböző biológiailag aktív formáit ismerjük: 14 és 17 aminosavat tartalmazó formái patkány, eger és emberi szövetekben is előfordulnak, 29 aminosavból felépülő formája pedig patkányban és emberben mutatható ki.

A CST-14-nek 11 aminosava megegyezik az SST-14-ével, többek között a két cisztein, melyek valószínűleg a peptidek ciklikus szerkezetéért felelősek, valamint az FWKT régió (Phe, Trp, Lys, Thr), amely kulcsfontosságú az sst receptorokhoz való kötődésben.

Kimutatták, hogy a CST képes mind az öt ismert sst receptorhoz való kötődésre. Neuronális aktivitást gátló hatása megegyezik a szomatosztatinéval. Az agykamrába (i.c.v.) beadott CST-14 a lokomotoros aktivitást csökkenti, ugyanakkor a nagyobb dózisban (10 µg) alkalmazott CST görcsöket váltott ki, ami az SST-14 injekciót követően is megfigyelt jelenség. Valószínű tehát, hogy a CST in vivo is képes az sst receptorokon hatni. A CST azonban az SST-től eltérően lassú hullámú alvást indukál, amely elsősorban az acetilkolin kérgi excitátoz hatásának csökkentésével jön létre. A CST mRNS expressziója cirkadián ritmust követ, és alvásmegvonás esetén fokozódik, mely ugyancsak arra utal, hogy a CST alvást moduláló neuropeptid is. Az endogén kortisztatin a szomatosztatinnal ellentétben stimulálja a prolaktin szekrécióját, CST génhiányos egerekben a keringésben lévő prolaktin szintje jelentősen csökkent. Friss kutatások a CST protektív szerepét mutatják a vaszkuláris kalcifikációval szemben patkányban, ami GHS-R1 receptoron keresztül valósulhat meg. Perifériás hatásait tekintve a CST-14 az SST-14-hez hasonlóan rendkívül hatásos gyulladásgátló, gátolja a Th1 sejtek proliferációját és a gyulladáskeltő citokinek (IL-2 és IFN $\gamma$ ) felszabadulását, továbbá elősegíti a gyulladást gátló mediátorok (IL-10, IL-1Ra) termelését. A CST SST-től eltérő biológiai hatásai alapján egy CST-specifikus receptor létezését feltételezik. Bár a CST gyulladásoz folyamatok sejtes komponenseire kifejtett gátló hatása jól ismert, nagyon keveset tudunk az érzőidegekre, neurogén gyulladásra és hiperalgéziára gyakorolt hatásairól.

### **CÉLKITŰZÉSEK**

Munkám e fejezetének célkitűzése a CST és SST hatásainak szisztematikus összehasonlítása volt gyulladásoz folyamatok jól definiált *in vitro* és *in vivo* mechanizmus modell-rendszereiben.

### **KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

#### **Kísérleti állatok**

Az *in vivo* kísérleteket hím CD1 egereken (25-30 g) és Wistar patkányokon (150-250 g) végeztük, az *in vitro* peptidfelszabadulási vizsgálatokhoz Wistar patkányok tracheáit használtuk. Az állatokat 24-25 °C-on, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva tartottuk és szaporítottuk.



### **-Kompetitív receptor kötődési vizsgálatok**

A kompetitív kötődési vizsgálatokat sst<sub>4</sub> és sst<sub>1</sub> receptorokat stabilan expresszáló CHO sejteken (CHO-sst<sub>4</sub>, CHO-sst<sub>1</sub>) végeztük. A konfluens sejtenyészetet 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 mg/ml bacitracint és 10 nM [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>]SST-14-et (általunk történő jelölés 125-ös I izotóppal) tartalmazó assay pufferben. Ezzel egyidőben a sejteket emelkedő koncentrációjú (10<sup>-9</sup>- 10<sup>-5</sup> M) CST-14-el inkubáltuk, majd a 30 perc letelte után mostuk azokat és lizáltuk. A lizátumot tartalmazó oldat radioaktivitását  $\gamma$  számlálóval mértük.

### **-Receptor aktiváció vizsgálata: [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötődési teszt**

A CHO-sst<sub>4</sub> és CHO-sst<sub>1</sub> sejteket homogenizáltuk, és membránfrakciókat készítettünk Tris-EGTA pufferben. A membrán frakciókat Tris-EGTA pufferben inkubáltuk, amely [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-t (0,05 nM) és emelkedő koncentrációjú SST-14-et és CST-14-et (10<sup>-9</sup>- 10<sup>-5,5</sup> M) tartalmazott. A reakciót a minták Whatman GF/B filteren való átszűrésével állítottuk meg. A filterpapír megszáradása után a membránfrakciókat tartalmazó filterdarabkákat kivágtuk, szcintillációs folyadékba helyeztük, ezek radioaktivitását Packard Tri-Carb 2800 TR szcintillációs számlálóval mértük. Az SST-14 és CST-14 által indukált G-protein aktivációt az agonista hiányában megfigyelt specifikus [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötődés százalékában adtuk meg.

### **-Stimulált peritoneális makrofágok interleukin-1 $\beta$ szintézisének vizsgálata**

Hím CD1 egereket *Salmonella typhimurium* endotoxinnal (LPS, 300  $\mu$ g/ml, 300  $\mu$ l) i.p. kezeltünk. 4 órával később az állatokat kivéztettük, majd a hasüreget átmostuk jéghideg sejtenyészítő médiummal, hogy összegyűjtsük a gyulladással sejtet. Ezután a peritoneális mosófolyadék-mintákhoz sejtenyészítő médiumot adtunk és a makrofágok stimulálását további 1  $\mu$ g/ml LPS oldattal végeztük. A kontroll kísérletekben fiziológiás sóoldatot, más esetekben SST-14-et vagy CST-14-et adtunk a rendszerhez. A sejtenyészítő lemezeket 8 órán át inkubáltuk standard körülmények között. Ezt követően minden lyuk tartalmát leszívtuk, centrifugáltuk, majd a sejteket flow cytometer segítségével azonosítottuk. Az IL-1 $\beta$  koncentrációját szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg.

### **-Kapszaicinnel kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulás vizsgálata izolált patkány trachea érzőideg végződéseiből**

Hím patkányok mély anesztézia alatti kivéztetését követően a trachea teljes egészében eltávolításra került, majd a tracheákat 60 percig (kiegyenlítődési periódus) perfundáltuk 7.2 pH-jú, oxigenizált Krebs oldattal 37 °C-on. Az áramlás megszakítása után az oldatot 3-szor cseréltük 8 percenként, hogy stimuláció előtti, stimulált és stimuláció utáni frakciókat nyerjünk. A második 8 perces periódusban kapszaicin stimulációt (10<sup>-6</sup> M) alkalmaztunk a neurotransmitter felszabadulás kiváltására. A CGRP koncentrációkat a szervfürdők 200  $\mu$ l volumenű mintáiból határoztuk meg a laborunk által kifejlesztett és leírt radioimmunoassay módszerrel. Minden frakció kezdetén SST-14-et, CST-14-et vagy fiziológiás sóoldatot adtunk az inkubációs médiumhoz. A hozzáadott vegyületek koncentrációja 10-2000 nM volt a különböző kísérletekben, egyazon trachea esetében csak egy koncentrációt alkalmaztunk a neuropeptid depléciónak érdekében.

### **-Mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata patkány lábhati bőrén**

Altatott patkányok mindkét oldali *n. saphenusát* és *n. ischiadicusát* átvágtuk 30 perccel a kísérletet megelőzően, hogy megakadályozzuk a mustárolaj nociceptív hatásából adódó reflexválaszokat. Az akut neurogén gyulladást a lábhati bőr 1%-os mustárolajjal való bekenésével váltottuk ki. A plazmafehérje-kiáramlás mértékét az Evans kék akkumuláció módszerével határoztuk meg. Tíz perccel a mustárolajjal történő kenés előtt intravénásan 50 mg/kg Evans kék festéket adtunk. Húszerével a gyulladás kiváltása után az állatokat elvéztettük és a kimetszett bőrterületek festéktartalmát formamidban extraháltuk 72 órán keresztül. Az oldat optikai denzitását spektrofotométerrel határoztuk meg. Az akkumulálódott Evans kék mennyiségét  $\mu$ g/g nedves

szövetre vonatkoztattuk. 20 perccel a gyulladás kiváltásának kezdete előtt SST-14-et, CST-14-et vagy a kontroll csoport esetében fiziológiás sóoldatot adtunk a hasüregbe.

**-Carrageenannel kiváltott mechanikai hiperalgéria és akut lábduzzadás mérése egérben, valamint gyulladási citokinek mérése a talpbőr homogenizátumokból**

Altatott hím CD1 egerek hátsó talpába 50 µl 3%-os carrageenan oldatot injektáltunk. 15 perccel a gyulladás kiváltását megelőzően valamint minden mérés előtt is, SST-14, CST-14 (100 µg/kg i.p.) vagy a kontroll csoportban fiz.sóoldat beadása történt. A mechanonoczeptív küszöb mérését 1, 2, 4, 6 és 23 órával a carrageenan adás után, a lábduzzadás mérését 6 órával a gyulladás kiváltása után végeztük. A talp mechanonoczeptív küszöbének meghatározását dinamikus plantáris eszteziométerrel végeztük. A lábak térfogatát pletizmométerrel mértük a gyulladás kiváltása előtt és 6 órával később. 24 órával a gyulladás kiváltását követően altatás alatt cervikális diszlokációt végeztünk, majd a talpbőrt kimetszettük és tömegét megmértük. Az IL-1β és TNFα koncentrációját szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg, a minták optikai denzitását spektrofotométerrel mértük meg.

**-Enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéria vizsgálata patkányban**

Hím patkányok (150-250 g) hátsó végtagjának fájdalmas hőküszöbét laboratóriumunk és az Experimetria Kft. (Budapest, Magyarország) által kidolgozott és validált emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük. A vízfürdő hőmérséklete 30°C-ról indul és fokozatosan 53°C-ig emelkedik. Az enyhe hőtrauma kiváltásához a kontrollméréseket követően az állatok egyik hátsó lábát éterbódításban 51°C-os állandó hőmérsékletű vízfürdőbe mártottuk 20 másodpercre, majd ismételt méréseket végeztünk. Az első mérés 20 perccel a hőtrauma után történt, ezzel igazoltuk a termális hiperalgéria kialakulását. Ezt követően SST-14-et, CST-14-et vagy a kontrollként fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk az egyik állatcsoportnál i.p. (100 µg/kg), a másikon intraplantárisan (i.pl.; 100 µl, 250 µg/ml-es oldatból). Ezután a hőküszöböket 80 percen keresztül ismételtén mértük 20 perccelként.

## **EREDMÉNYEK**

**A kortisztatin sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorokhoz való kötődési képessége**

A növekvő koncentrációban ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) alkalmazott CST-14 leszorította a 10 nM radioaktívan jelölt SST-14-et mind a CHO-sst<sub>4</sub>, mind a CHO-sst<sub>1</sub> sejtekről, koncentrációfüggő módon. A maximális gátlást a  $10^{-6}$  M CST eredményezte (98,4%) az sst<sub>4</sub> sejtek esetében, és ugyanez a koncentráció a CHO-sst<sub>1</sub> sejteknél (83,6%). Az IC<sub>50</sub> érték 12 és 18 nM volt mindkét sejtípus esetén, a CST-14 és SST-14 hasonló affinitását jelezve e receptorokhoz.

**A kortisztatin és szomatosztatin által kiváltott G-protein aktiváció**

Mindkét peptid emelkedő koncentrációja a [<sup>35</sup>S]GTPγS kötődés fokozódását eredményezte, koncentrációfüggő módon. EC<sub>50</sub> értéként azt a ligandkoncentrációt határoztuk meg, mely a maximális válasz 50%-át produkálja. Az SST-14 esetében ez az érték 10 nM volt a CHO-sst<sub>4</sub> sejteken és 13 nM a CHO-sst<sub>1</sub> sejteken. A CST-14 EC<sub>50</sub> értékei 33 nM és 28 nM voltak a CHO-sst<sub>4</sub> és CHO-sst<sub>1</sub> sejteken. A maximális aktiváció értéke a [<sup>35</sup>S]GTPγS kötődés fokozódásának a bazális aktivitáson túli százaléka. SST-14 kezelésnél a maximális aktiváció 218% és 204% voltak a CHO-sst<sub>4</sub> és CHO-sst<sub>1</sub> sejteken. A CST-14 megfelelő értékei 223 és 218% voltak, a két peptid hasonló hatékonyságát jelezve.

### **A szomatosztatin és kortisztatin hatása stimulált peritoneális makrofágok interleukin-1 $\beta$ szintézisére**

Az IL-1 $\beta$  koncentrációja a peritoneális makrofág tenyészetben 473,76 $\pm$ 38,81 pg/ml volt a kontroll csoportban, 100  $\mu$ l fiziológiás sóoldatot alkalmazva. 0,1  $\mu$ g/ml SST-14 vagy ugyanennyi CST-14 jelenléte nem befolyásolta a gyulladáshoz szükséges citokin mennyiségét. Ugyanakkor a peptidok magasabb koncentrációja (1 és 10  $\mu$ g/ml) szignifikánsan csökkentette az IL-1 $\beta$  termelést: az SST-14 kb. 33-35% csökkenést, a CST-14 jelentősebb, kb. 70-75%-os citokintermelődés-csökkenést idézett elő. Koncentráció-válasz összefüggést nem figyeltünk meg ebben a dózistartományban.

### **A szomatosztatin és kortisztatin hatása izolált patkány trachea érzőideg-végződéseiből kapszaicinnal kiváltott szenzoros neuropeptid-felszabadulásra**

Az SST-14 és a CST-14 is szignifikáns mértékben gátolta a stimuláció-kiváltott CGRP felszabadulást. A koncentráció növelésével a hatás egyik esetben sem fokozódott, sőt, a legnagyobb gátlást a legkisebb SST koncentráció eredményezte. A 2 $\mu$ M CST-14 és 100 nM SST-14 gátló hatása hasonló mértékű volt, 85 és 87%. Maximális gátló hatásnak ezeket tekinthetjük, magasabb koncentrációkban mindkét peptid kisebb hatással rendelkezett. Egyik peptid sem befolyásolta a bazális, stimuláció nélküli CGRP felszabadulást.

### **A szomatosztatin és kortisztatin hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra patkány lábháti bőrén**

Mind az SST-14, mind a CST-14 szignifikánsan csökkentette a mustárolajjal kiváltott plazmafehérje-kiáramlást 20 perccel a gyulladáshoz szükséges stimulus helyi alkalmazását követően. Az SST-14 kb. 60%-os, a CST-14 jelentősen nagyobb mértékű, majdnem 80% gátló hatást fejtett ki.

### **A szomatosztatin és kortisztatin hatása a carrageenannel kiváltott mechanikai hiperalgériára, akut lábduzzadásra, valamint gyulladáshoz szükséges citokin-termelésre egérben**

A 3% carrageenan intraplantáris injekciójának hatására jelentős mechanikai hiperalgéria és lábduzzadás alakult ki a kontroll egércsoportban (kb. 40% maximális hiperalgéria és 55% duzzadás a 6 órás időpontban). 100  $\mu$ g/kg i.p. SST-14 kezelés hatására gátló tendenciát figyeltünk meg, de a gátlás csak a 4 órás mérési pontban bizonyult szignifikánsnak. CST-14 kezelést követően a hiperalgéria 2-23 óráig minden mérési pontban szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoport esetén. A lábduzzadást hasonló mértékben, kb. 30-35%-kal csökkentette mindkét peptid a 6 órás időpontban.

A carrageenan kezelés jelentős mértékű IL-1 $\beta$  és TNF $\alpha$  felszabadulást okozott a fiziológiás sóoldattal kezelt csoport talpbőrén. 100  $\mu$ g/kg i.p. SST-14 és CST-14 szignifikánsan csökkentette az IL-1 $\beta$  szintézist, de a TNF $\alpha$  szintézist csak a CST-14 mérsékelte szignifikáns módon.

### **A szomatosztatin és kortisztatin hatása az enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgériára patkányban**

A hőtrauma utáni ébredést követően egy állatnál sem figyeltünk meg spontán nocifenzív viselkedést. 20 perccel a hőtraumát követően a termonoczeptív küszöb 5-6  $^{\circ}$ C-os esését tapasztaltuk, ez a hő hiperalgéria fennmaradt a kísérleti periódus 80 perce folyamán. A fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest az i.p. és i.pl. SST-14 és CST-14 hasonló mértékben és szignifikánsan csökkentette a termális hiperalgériát végig a vizsgálati periódus alatt, bár az i.p. CST-14 gátló hatása nem volt statisztikailag szignifikáns a legkorábbi, 40 perces mérési időpontban.

## MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Összehasonlító kísérleteink alapján arra következtetünk, hogy a SST és CST hasonló kötődési profillal és agonista tulajdonsággal rendelkezik az sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> szomatosztatin receptorokon. Csoportunk korábbi eredményei alapján e receptorok közvetítik az SST gyulladásgátló és antinociceptív hatásait. Eredményeink újdonságtartalma abban rejlik, hogy *in vitro* és *in vivo* bizonyítékokat szolgáltatnak arra, hogy ezek a peptidek jelentősen gátolják a szenzoros neuropeptid CGRP felszabadulását a perifériás szenzoros idegvégződésekből, a következményes akut plazma protein extravazációt, valamint a hő- és mechanikai hiperalgéziát. A Capuano és munkatársai által 2011-ben közölt eredmények, miszerint a CST és SST gátolta a kémiai kiváltott CGRP felszabadulást patkány trigeminus idegsejttenyészetben, alátámasztják a perifériás idegvégzések szintjén tapasztalt eredményeinket. Az érdekes jelenség, hogy nagyobb koncentrációkban a CST és az SST CGRP felszabadulást gátló hatása csökken, illetve megszűnik, peptidek esetében nem ritka. 5-HT, opioid és kannabinoid receptorokon ható nem-peptid struktúrájú vegyületek esetében is hasonló fordított, vagy harang alakú koncentráció-hatás összefüggés tapasztalható. Ennek magyarázatául a nagyobb koncentrációk esetén fellépő receptor-deszenzibilizáció, illetve internalizáció szolgálhat. A CST és SST neurogén gyulladásra és hiperalgéziára kifejtett hasonló hatásai mellett a CST-14 szignifikánsan nagyobb gátló hatással rendelkezik a gyulladás sejtes komponenseire, ahogy azt a peritoneális makrofágok endotoxin-stimulált IL-1 $\beta$  termelésénél és az eger talpbőr carrageenan-kiváltott TNF $\alpha$  szintézisének látjuk. A szintetikus, szelektív sst<sub>4</sub> receptor agonista J-2156-tal nyert korábbi, peritoneális makrofágok IL-1 $\beta$  termelésére vonatkozó eredményeink összhangban vannak jelen adatainkkal, a legnagyobb, kb. 70-75% gátló hatást mindkét esetben a 1  $\mu$ g/ml-es koncentrációval értük el. A carrageenannel kiváltott lábduzzadást és mechanikai hiperalgéziát mindkét peptid hasonló mértékben gátolta.

Bár az SST hatáserőssége nagyobb volt a perifériás idegvégződésekből történő CGRP felszabadulására, mint a CST-é (az SST 100 nM koncentrációja hatékony, míg a CST igazán 2000 nM koncentrációban hat), a hatékonysága (maximális hatás) megközelítőleg ugyanolyannak bizonyult. Ez nem zárja ki azonban annak a lehetőségét, hogy mindkét peptid ugyanazon a receptoron hat, mindössze eltérő receptor aktiváló képességük (intrinszik hatékonyságuk) lehet.

A CST a lokomotoros aktivitást csökkenti, de az SST-vel ellentétben lassú hullámú alvási indukál. Ez alapján saját CST receptor létezését vagy más struktúrákon, mint pl. a Mas1 onkogénnel összefüggő MrgX2 (Mas-rokon gén) orphan receptoron való hatásait feltételezik. Ez utóbbi receptorok nocicepcióban betöltött szerepére utal, hogy a hátsó gyöki ganglionok kis szenzoros neuronjaiban expresszálódnak. Kvantitatív PCR vizsgálatok a CST MrgX2 receptorokénál sokkal szélesebb expresszióját igazolták. A SST-től eltérően a CST-nek nagy az affinitása a ghrelin receptor (GHS-R1a) iránt, melynek szerepét a gyulladásgátló hatás hátterében is feltételezik. A CST-14 és az SST-14 fiziológiai hatásai között megfigyelt eltérések hátterében receptor internalizációs különbségek is állhatnak, mint például a  $\mu$  receptorokon is ható morfin és methadon esetében. Kimutatták, hogy a kortisztatin mRNS expressziója szomatosztatin génhiányos állatokban nem emelkedett, ami feltételezi, hogy a CST nem csupán egy szerkezeti módosulata az SST-nak.

Mivel eredményeink alapján a CST hasonló mértékben csökkentette az akut neurogén gyulladást és hiperalgéziát, mint az SST, valószínűleg a szenzoros idegvégzésekben lévő sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorok aktivációja játszik ebben szerepet. Az immunsejtek funkciójának gátlását az sst<sub>2</sub> receptor aktivációja is közvetítheti. Carlton és munkatársai a fájdalomcsillapító hatás hátterében az sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptorok részvételét is lehetségesnek tartják. Mivel a termális hiperalgézia e típusában döntő szerepet játszik a perifériás idegvégzések gyors szenzitivációja, ennek a gátlása valószínűleg független a gyulladásgátló hatásoktól. Lokális alkalmazás esetén ezek az anyagok csak a perifériás idegvégzésekben képesek hatni, de szisztémás adás esetén is ez a fő hatáshelyük, aminek az a magyarázata, hogy ezek a viszonylag nagy peptidek valószínűleg nem képesek olyan koncentrációban átjutni a vér-agy gáton, hogy biológiai hatást fejthessenek ki a központi idegrendszerben. A perifériás hatások mellett a CST a centrális fájdalom feldolgozás folyamatában

is szerepet játszhat, ugyanis cerebroventrikuláris alkalmazása emelte a hőstimulációra megjelenő nocifenzív magatartás latenciáját.

A CST gyulladássos és immunsejteken kifejtett hatásaira számos irodalmi adat áll rendelkezésre, azonban rendkívül kevés adat szól a neurogén mechanizmusokban betöltött szerepéről. A CST mérsékli a szepszis-kiváltotta halálozást, egyrészt az aktivált makrofágok gyulladássos mediátorainak termelését gátolva, másrészt csökkentve a neutrofilek és monociták beáramlását a gyulladt szövetekbe. A CST kollagén-indukált artritiszben kifejtett gyulladásgátló hatásának fő mechanizmusa a rezidens és beáramló makrofágok aktivitásának csökkentése. Ebben a modellben a CST szignifikánsan nagyobb gátló hatást fejtett ki, mint a SST, ami alátámasztja, hogy a CST a SST-tól eltérő receptorokat és jelátviteli utakat aktiválhat.

Eredményeink párhuzamba állíthatók Gonzalez-Rey és kollégái adataival, miszerint a CST gátolja a TNF $\alpha$  és IL-6, valamint az endotoxin-aktivált egér peritoneális makrofágok nitrogén-monoxid termelését. A CST nagyobb gátló hatást fejtett ki e gyulladássos mediátorok termelésére, mint az SST, vagy a szintetikus sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub>, sst<sub>5</sub> receptor agonista oktreotid. Bár a nem szelektív SST receptor antagonisták cikloszomatostatin kivédte az SST hatásait, csak részben gátolta a CST hatását, feltételezve, hogy a CST más receptorokon keresztül is kifejtheti gyulladássos sejt funkciókat csökkentő hatásait.

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a CST képes csökkenteni az akut neurogén gyulladást, a termális és mechanikai hiperalgéziát. Ebben valószínűleg fontos szerepet játszik a proinflammatorikus szenzoros neuropeptidok felszabadulásának gátlása a perifériás idegvégződésekből, és valószínűleg hasonlóképpen a centrálisakból is. Mivel ezek a hatások nagyon hasonlóak a SST hatásaihoz, a szomatostatin receptorok aktivációja feltételezhető a folyamatban. Ezzel szemben a CST a SST-nál jelentősen nagyobb gátló hatást fejt ki a gyulladássos citokinek termelésére, amely a gyulladássos folyamatok fontos komponense, és valószínűleg a sst receptoroktól eltérő mechanizmussal valósul meg.

### 3. A PACAP TRIGEMINOVASZKULÁRIS AKTIVÁCIÓBAN BETÖLTÖTT SZEREPE

#### ELŐZMÉNYEK, IRODALMI HÁTTÉR

##### A PACAP és szerepe a nocicepcióban

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP: pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide) a szekretin-glukagon-vasoaktív intesztinális polipeptid (VIP) család tagja. Két biológiailag aktív formája létezik: az emlős szervezetekben 90%-ban előforduló PACAP-38, és a PACAP-27. Patkányban a legnagyobb koncentrációban a hipotalamuszban és a herében fordul elő. Szenzoros neuropeptidként tartják számon, mivel megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában, a hátsó gyöki ganglionokban, a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben, pl. az ízületi tokot ellátó afferensekben, de a központi idegrendszer számos területén is. Immunhisztokémiával PACAP pozitív sejteket mutattak ki az emberi agytörzs ún. „migrén-generátor” régiójának sejttestjeiben és idegrostjaiban, továbbá a nucleus caudalis trigeminiben és a nyaki gerincvelő C1-C2-es szegmentumaiban. A dura mater perivaszkulárisan található és a neuronokkal szoros asszociációban lévő hízósejtjei szintén tartalmaznak PACAP-ot. Aktiválódásuk bekövetkezhet trigeminális idegaktiválódást, cervikális vagy sphenopalatin ganglion stimulációt követően.

A PACAP rendkívül sokféle hatást fejt ki: szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását, értágulatot, illetve bronchodilatációt okoz, fokozza a bélmotilitást, növeli egyes hormonok koncentrációját a vérben, szabályozza a sejtproliferációt és gátolja az apoptózist. Ezek a hatások speciális receptorokon keresztül valósulnak meg. Két kötőhelytípust mutattak ki PACAP- és VIP-kötő képességük alapján. Az I-es típusú kötőhelyhez a PACAP mindkét formája nagy affinitással kötődik, a VIP viszont csak alig. A II-es típusú kötőhelyhez a PACAP és a VIP is hasonló affinitással kötődik, itt két altípust is elkülönítenek a szekretinhez való affinitás alapján. A receptorokat később klónozták, és PAC1, valamint VPAC1/VPAC2 receptoroknak nevezték el. Mindhárom receptor neuronokon, simaizom sejteken és számos gyulladássos sejten megtalálható, stimulációjuk Gs/q-proteinhez kapcsolt mechanizmusokat indít el, ezen keresztül aktiválódik az adenilát-cikláz, illetve a foszfolipáz C rendszer.

Mivel a PACAP-38 jelenlétét a fájdalomközvetítő pályarendszer több szintjén, pl. a gerincvelő hátsó szarvában, a hátsó gyöki ganglionokban és a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben is bizonyították, feltételezhető volt, hogy a PACAP részt vesz a nociceptív folyamatokban. Ezt az elképzelést azonban rendkívül kevés funkcionális adat támasztotta alá, az összes erre irányuló *in vivo* kísérletben kizárólag a PACAP központi idegrendszeri hatásait vizsgálták és meglehetősen ellentmondásos eredményekre jutottak. Az intratekálisan adott PACAP gátolta a nociceptív reflexműködést és a gyulladás következtében kialakuló nocicepciót. I.c.v. adva a PACAP a formalin teszt korai, az érzőideg-végzések közvetlen aktivációjából adódó fázisban analgetikus hatásúnak, míg a késői, akut gyulladássos fázisban pronociceptívnek bizonyult. Másrészről azonban a központi idegrendszerbe adott PACAP dóziszfüggő módon csökkentette a hőküszöböt a talpban, és szerepet játszott a nociceptív stimulus hátsó szarvba történő közvetítésében, elsősorban N-metil-D-aszpartát receptorokon keresztül. Macskákban az intracerebrális PACAP mikroinjekció közepes mértékű agyi vérátáramlás-fokozódást okoz. Bár a PACAP jelenléte kimutatható az emberi és állati agy trigeminális rendszerrel összefüggő számos régiójában, lehetséges szerepe a trigeminovaszkuláris aktivációban csak mostanában merült fel a PACAP és PAC1 receptorok patkány és humán intrakraniális ereinek simaizombeli lokalizációja alapján. Nemrég felfedezés, hogy migrénesekben a PACAP infúzió aura nélküli migrénszerű fejfájást okoz. Ezen klinikai megfigyelések alapján feltételezik, hogy a PACAP fontos mediátor lehet a trigeminovaszkuláris aktivációban, ami a migrén fontos patofiziológiai tényezője.

## **A trigeminovaskuláris aktiváció és szerepe migrénben**

A migrén a priméren neurovaszkuláris fejfájások csoportjába tartozik. E betegségek fő tulajdonsága, hogy a fájdalom szoros összefüggésben van az intrakraniális érrendszer változásaival. Ezek a változások neurális hátterűek, ezért beszélhetünk neurovaszkuláris történésekről. Kísérletesen a kraniális fájdalom vazodilatációt vált ki, ez a reflex macskákban, majmokban és emberben is létezik. A reflex úgy valósul meg, hogy a trigeminus ideg első ágának aktivációja véráramlás-fokozódást eredményez az első ág által beidegzett területeken, az arcon és az agyban egyaránt. A primer neurovaszkuláris fejfájás kóros volta az eredendően protektív reflex túlzott mértékű aktivációjában rejlik, amit a fájdalom percepciója vált ki. A dura matert, a nagy cerebrális ereket, a pia ereit és a nagy vénás szinuszokat mielinhüvely nélküli rostok kötege veszi körül, melyek a ganglion trigeminum optalmicus ágából és a felső cervikális hátsó gyökökből erednek. Az agyi ereket beidegző trigeminus rostok a ganglion trigeminumból erednek, melyek SP-t és CGRP-t tartalmaznak. A trigeminus ganglion stimulációja esetén mindkét peptid felszabadul. A koponya ereinek stimulációja - mint a sinus sagittalis superioré - fájdalmat vált ki emberben.

Bármilyen szerepet játszik a dura mater steril gyulladása a migrén patomechanizmusában, az bizonyos, hogy a trigeminális szenzitizáció valamely formája részt vesz a folyamatban. A szenzitizáció lehet perifériás, gyulladáshoz vezető mediátorok lokális felszabadulásának következtében, mely valószínűleg a trigeminális nociceptorok kóros aktivációját eredményezi. Még valószínűbb migrén során a szenzitizáció centrális formája, amely lehet klasszikus érzékenység-fokozódás a trigeminus mag területén, vagy a leszálló fájdalommoduláló pályák diszfunkciója. A migrén patomechanizmusában neuropeptideknek is fontos szerepet tulajdonítanak. A trigeminus ganglion elektromos stimulációja macskában és emberben egyaránt az extracerebrális vérátáramlás megnövekedéséhez és CGRP valamint SP lokális felszabadulásához vezet. Humán adat is létezik, miszerint a CGRP szintje emelkedett a migrén fejfájásos fázisában, alátámasztva a teóriát, miszerint a trigeminovaskuláris rendszer aktivációja kulcsfontosságú ezen állapotokban. A CGRP mellett a PACAP is kimutatható az emberi és állati agy trigeminális rendszerrel összefüggő számos régiójában.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a PACAP szerepét a migrén mechanizmusait modellező trigeminovaskuláris aktivációban génhányos egerek segítségével. Bár az emberi betegségnek teljes egészében megfelelő állatmodell nem létezik, az általunk vizsgált kísérletes megközelítés számos tekintetben párhuzamba állítható a migrén patofiziológiai folyamataival.

## **KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

### **Kísérleti állatok**

Kísérleteinket hím, 25-30 g súlyú PACAP génhányos (PACAP<sup>-/-</sup>) és vad típusú (PACAP<sup>+/+</sup>) egereken végeztük. A génhányos egereket Prof. Akemichi Baba és munkatársai (Osakai Egyetemen) állították elő, a heterozigóta tenyészpárokat tőlük kaptuk. Az állatokat 24-25 °C-on, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva tartottuk és tenyésztettük. Kísérleteinkben az első három generáció utódait használtuk a genetikai variációk minimalizálása érdekében.

### **Kísérleti modell:**

#### **-A trigeminovaskuláris rendszer kémiai aktivációja**

A trigeminovaskuláris rendszer aktiválását 10 mg/kg nitroglicerinnel (NTG) i.p. injekciójával váltottuk ki, amely NO donor (Nitrolingual aerosol).

## **Vizsgálati módszerek:**

### **-A fénykerülő magatartás vizsgálata**

A fény-averzív magatartást az NTG adás utáni korai (0-30 perc) és késői periódusban (90-120 perc) vizsgáltuk. A vizsgálathoz egy módosított sötét-világos dobozt használtunk, amely két egyenlő részre osztott, egy nyitott, 1000 luxszal megvilágított fehér részre és egy zárt, sötét részre. A részeket nyílás köti össze. A fényben töltött időt másodpercben kifejezve, 5 perces periódusokban értékeltük.

### **-A meningeális mikrocirkuláció vizsgálata laser Doppler scanning módszerrel**

A meningeális mikrocirkuláció változását laser Doppler vérátáramlás-scanner segítségével, uretánnal altatott egerekben vizsgáltuk, zárt koponyán keresztül. A kontroll felvételek után i.p. 10 mg/kg NTG-t injektáltunk és a vérátáramlás változását 4 órán keresztül követtük. PACAP-38 bevitele esetén a megfigyelési periódus 30 percig tartott. A mikrocirkuláció-változás értékelésére a koponya egy körülhatárolt régiójának átlagos mikrocirkulációs értékeit a kontroll felvételek átlagértékeivel hasonlítottuk össze a megfigyelési idő függvényében. A szisztémás vérnyomás értékeit az *arteria carotis communis*ba vezetett kanül segítségével regisztráltuk és a Buxco Biosystem XA szoftver segítségével értékeltük.

### **-A korai neuronális aktiváció vizsgálata c-Fos immunhisztokémiával**

Mély uretán altatásban lévő PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egereket használtunk immunhisztokémiára, 2 és 4 órával az NTG beadást követően. Az állatok perfundálását követően a nyaki gerincvelő felső szakaszát és a trigeminális ganglionokat kipreparáltuk és utófixáltuk. A gerincvelői trigeminus mag tanulmányozásához a nyúltvelőt a gerincvelő felső szakaszával beágyaztuk. Állatonként három sorozat, 20 µm vastagságú coronális metszetet készítettünk. A metszeteket poliklonális, c-Fos elleni antiszérummal (sc-52, 1:500) inkubáltuk, majd biotinizált borjú anti-nyúl IgG-vel kezeltük (1:200, Vectastain Elite ABC Kit). Avidin-biotin komplexszel (Vectastain Elite ABC Kit) való inkubáció után az előhívás 0,05% diaminobenzidin és hidrogén-peroxid segítségével történt.

A trigeminus ganglionokon végzett immunhisztokémia parrafinba ágyazott metszeteken történt. Három sorozat, 4 µm vastag hosszanti metszetet készítettünk. A c-Fos immunhisztokémiára a metszetek első sorozatát használtuk a fent leírt protokoll szerint. A metszetekről digitális képek készültek (Nikon Eclipse 80i mikroszkóp CCD kamerával), amelyeket Photoshop 7.0.1. (Adobe, San Jose, CA, USA) segítségével korrigáltuk. A TNC és a TRG c-Fos pozitivitásának meghatározásához állatonként öt metszeten megszámoltuk a c-Fos pozitív sejtmagokat és ezeket átlagoltuk.

### **-A PACAP-38 exogén bevitele**

PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek egy-egy csoportjának PACAP-38-at injektáltunk i.p. (300 µg/kg, 0,1 ml/10 g a 30 µg/ml-es oldatból) a fénykerülő magatartás, a meningeális vérátáramlás-változás és a 4 órával későbbi c-Fos expresszió vizsgálatára. Két másik csoportban a PACAP-38-at i.c.v. adtuk mély uretán anesztézia alatt. A c-Fos expresszió változását 4 órával a kezelés után vizsgáltuk. Minden esetben fiziológiás sóoldattal kezelt állatok szolgáltak kontrollként.

### **-A PAC1 receptor expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel**

Megvizsgáltuk a PAC1 receptor expresszióját a trigeminus ganglionban és a nucleus caudalis trigeminiben c-Fos immunhisztokémia segítségével. Az előkészített metszeteket primer antitesttel kezeltük (nyúlban termelt anti-PAC1 receptor, 1:100 hígítás), a másodlagos antitest Alexa Fluor „568” (1:1000) volt. Csoportonként tíz metszetet értékeltünk. A primer antiszérum nélküli negatív kontroll metszeteken specifikus sejttestődés nem volt megfigyelhető. A digitális képek elkészítése után az optimális kontrasztot Photoshop 7.0.1 segítségével értük el.



## EREDMÉNYEK

### A nitroglicerinnel kiváltott fénykerülő magatartás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

Az NTG-vel kezelt vad típusú egerek a 20. perctől kezdve szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a világos részben a fénykerülő magatartás kialakulásának megfelelően. Ezzel ellentétben a nitroglicerinnel kezelt knockout állatok nem mutattak fény-averziót.

A vizsgálat második, késői fázisában (90-120 perc) a vad típusú, NTG-vel kezelt állatok jelentősen kevesebb időt töltöttek a doboz fényes részében, különösen a vizsgálati periódus végső szakaszában. A korai fázishoz hasonlóan, a PACAP génhíányos csoport nem mutatott fénykerülő magatartást.

### A nitroglicerinnel kiváltotta agyfelszíni vazodilatáció PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

Laser Doppler scanning vizsgálataink során 2 órával az NTG beadását követően a meningeális vérátáramlás jelentős mértékű emelkedését tapasztaltuk PACAP<sup>+/+</sup> egerekben, amely stabilan fennállt a megfigyelési idő alatt, csökkenést csak az utolsó 15 percben figyeltünk meg. Ezzel szemben a PACAP<sup>-/-</sup> állatcsoport esetében nem tapasztaltunk vérátáramlás-fokozódást az első 2 órában, és a későbbi hiperémiás hatás is jelentősen kisebb volt.

A szisztémás vérnyomás középértéke mindkét csoportban 30-35%-kal csökkent nitroglicerinnel hatására, uretán anesztézia alkalmazása mellett.

### A nitroglicerinnel kiváltotta c-Fos expresszió változása NTG-kezelt PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek trigeminus ganglionjaiban és trigeminus nucleus caudalisában

Nitroglicerinnel adást követően 2 órával egyik csoport esetében sem figyeltünk meg c-Fos expresszió változást a TRG-ben a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva. A vad típusú, PACAP<sup>+/+</sup> egércsoportban 4 órával a kémiai stimulációt követően kb. kétszeres c-Fos expresszió emelkedést találtunk a TRG-ben, míg a génhíányos egércsoportnál nem tapasztaltunk változást. A vad típusú egértörzs esetén a TNC-ben több mint kétszeresére emelkedett a c-Fos pozitivitás a kontrollcsoporthoz képest, már az NTG-alkalmazását követően 2 órával. Ugyanakkor e sejtszámok 4 órával a kezelést követően közel háromszoros emelkedést mutattak. Ezzel ellentétben a c-Fos expresszió mindegyik időpontban változatlan maradt a génhíányos egércsoportban.

### A PAC1 receptor expressziója PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek trigeminális ganglionjaiban és trigeminális nucleus caudalisában

Az immunfluoreszcens reakció alapján mindkét csoport trigeminális ganglionjaiban és nucleus caudalisában a PAC1 receptor hasonló mértékben expresszálódik. A kétutas ANOVA-val történt mennyiségi analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a TRG-ben sem a genotípust, sem az NTG kezelést vagy ezek interakcióját tekintve. Ehhez hasonlóan a TNC-ben sem a genotípus, sem a kezelés, sem ezek interakciója nem befolyásolta szignifikáns mértékben a receptor kifejeződését. Ebből arra következtetünk, hogy a genotípus vagy az NTG stimuláció nem befolyásolja a PAC1 receptor expresszióját ezeken a területeken.

### A PACAP-38 által kiváltott fénykerülő magatartás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

A 300 µg/kg PACAP-38 i.p. injekciója jelentős fény-averzív magatartást váltott ki a vad típusú, PACAP<sup>+/+</sup> egerekben mind a 2 órás megfigyelési idő korai, illetve késői fázisában. E fotofóbia megjelenése és mintázata nagyon hasonló volt az NTG-kezelés által kiváltott hatáshoz. A génhíányos, PACAP<sup>-/-</sup> egércsoportban nem tapasztaltunk fénykerülő magatartást PACAP-38 hatására.

### A PACAP-38 által kiváltott meningeális vazodilatáció PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

A vad típusú egércsoportban 300 µg/kg i.p. PACAP-38 hatására 20%-os agyfelszíni mikrocirkuláció-fokozódás alakult ki. Ugyanez a kezelés a génhíányos egércsoportban nem váltott ki mikrocirkuláció-változást az első 15 percben, és a második 15 perces periódusban is csak 10%-os

emelkedést eredményezett. Ez szignifikánsan kisebb mértékű válasz volt a PACAP<sup>+/+</sup> egércsoportban megfigyelhető képest.

A szisztémás vérnyomás 80,6±0,4 Hgmm-ről 62,8±0,1 Hgmm-re csökkent 10 percen belül és megközelítőleg változatlan maradt a 30 perces mérés alatt. A két csoport között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető.

### **A PACAP-38 által kiváltott c-Fos expresszió PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek trigeminális ganglionjaiban és trigeminális nucleus caudalisában**

Az i.p. PACAP-38 injekció szignifikánsan növelte a neuronális aktivációt jelző c-Fos expressziót 4 órával a beadás után mindkét csoport trigeminus ganglionjaiban, de csak a PACAP<sup>+/+</sup> csoport nucleus caudalisában. Ezzel összehasonlítva az agykamrába injektált PACAP-38 nem növelte a c-Fos pozitív neuronok számát sem a vad típusú, sem a génhányos csoport vizsgált régióiban. Érdekes módon a PACAP<sup>+/+</sup> egerekben mindkét területen jelentősen emelkedett a c-Fos expresszió i.c.v. adást követően az i.p. injekcióhoz viszonyítva, nemcsak a PACAP, hanem a fiziológias só adása után is. Szignifikánsan kisebb mértékű c-Fos immunpozitivitást tapasztaltunk azonban a PACAP hiányos egerek trigeminus ganglionjában, mind fiziológias sóoldat, mind PACAP-38 i.c.v. adása után.

### **MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK**

Magatartási, funkcionális és morfológiai vizsgálatokkal PACAP génhányos egerekben nyert eredményeink bizonyítják a PACAP fontos, aktiváló szerepét a trigeminovazkuláris rendszerben. Ezt az aktiváló szerepet egyrészt közvetlenül a meningeális erekben, másrészt a TRG és a TNC szintjén fejt ki. A PACAP lehetséges szerepét a trigeminovazkuláris rendszerben már korábban is feltételezték az emberi agytörzs ún. „migrén generátor” régiójában való lokalizációja alapján, a TNC-ben és a nyaki gerincvelő C1-C2-es szegmentumában való jelenléte, valamint a dura mater hízósejtjeiben történő előfordulása miatt. Ezen immunolokalizációs eredmények jelentőségét tovább erősítette a PACAP és PAC1 receptor kifejeződése az arteria meningeá media simaizomzatában, valamint azok a klinikai adatok, amelyek migrénes páciensekben a PACAP infúziós adagolása következtében kialakuló erős fejfájásról számoltak be.

A nitroglicerinnel való leadása révén a trigeminovazkuláris rendszer stimulációjához vezet az erek és a szenzoros idegvégződések, valamint a TRG és a TNC szintjén, amely perifériás és centrális szenzitizációt hoz létre.

A fény-averzió állatkísérletes vizsgálatára szolgált a világos-sötét doboz. Kísérleteinkben az NTG jelentős mértékű fénykerülő magatartást váltott ki a vad típusú egerekben, míg ez szignifikánsan kisebb volt a génhányos, PACAP<sup>-/-</sup> állatcsoportban.

Az i.p. NTG vad típusú egerekben jelentős mértékű meningeális vazodilatációt eredményezett 4 órán keresztül. Ezzel szemben a PACAP génhányos csoportban a kezelés a kísérlet első 2 órájában nem váltott ki mikrocirkuláció-fokozódást, a későbbi fázisban pedig szignifikánsan kisebb emelkedést okozott. A PACAP<sup>+/+</sup> egércsoportban a c-Fos pozitív sejtek száma korábban és nagyobb mértékben emelkedett a TNC-ben, mint a TRG-ben, alátámasztva a teóriát, miszerint a centrális szenzitizáció elengedhetetlen kezdeti folyamata az NTG-indukált trigeminovazkuláris aktivációnak. Négy órával az NTG injekciót követően a vad típusú egércsoportban a c-Fos immunpozitivitás jelentős emelkedését figyeltük meg a TRG-ben is. A génhányos csoportban a c-Fos expresszió egyik időpontban sem változott, alátámasztva a centrális és perifériás szenzitizáció hiányát. Mindezek alapján a PACAP kulcsfontosságú mediátornak bizonyult a migrénnel összefüggő neuron aktivációs folyamatokban. A migrén pathomechanizmusában a megnövekedett meningeális vazodilatáció és neurogén gyulladás mellett fontos tényező a trigeminális neuronok hyper-excitabilitása egyrészt a TRG, másrészt a TNC szintjén, amely kóros szenzoros információfeldolgozást eredményez. A PACAP trigeminovazkuláris rendszert aktiváló mechanizmusa jól magyarázható a PAC1 és VPAC receptorokon keresztül megvalósuló, Gs és Gq

protein-asszociált jelátviteli folyamatokkal. Az emelkedett intracelluláris cAMP szint vazodilatációt, a cAMP és  $Ca^{2+}$  szint emelkedése idegi stimulációt és hízósejt degranulációt eredményez. A PACAP és a CGRP trigeminovaszkuláris rendszerben való részleges kolokalizációja miatt elképzelhető, hogy excitátoros hatásuk egymáshoz kapcsolódik. A lehetséges interakciók felderítéséhez szelektíven ható, centrális antagonistákra lenne szükség. A PAC1 receptor expressziója hasonló mértékű a TRG-ben és a TNC-ben a vad típusú és a PACAP génhányos egerekben, amely bizonyítja, hogy a peptid hiánya nem befolyásolja specifikus receptorának jelenlétét és mennyiségét ezeken a migrénnel összefüggő agyterületeken. Ezek az adatok összhangban állnak más szövetekből nyert eredményekkel. Ezen felül, a funkcionális tesztekben és c-Fos expresszióban talált különbségek ellenére a PAC1 receptor expressziója nem változott egyik csoportban sem az NTG stimulációt követő 4 órában. Bár a VPAC receptorok szerepe nem zárható ki a PACAP trigeminovaszkuláris hatásaiban, kísérleteinkben a PAC1 receptor szerepére összpontosítottunk. Ennek oka, hogy a PAC1 a PACAP specifikus receptora, ami iránt a PACAP nagyobb affinitással rendelkezik, mint a VPAC receptorok iránt, valamint jelentősen kisebb nociceptív válaszokat regisztráltak a PAC1 receptorral nem rendelkező egerekben. Emellett a PACAP migrénszerű fejfájást okozott emberben, míg a VIP nem. Mindezek alapján a PAC1 receptort tartják potenciális új célpontnak a migrénelles terápiaiban.

A PACAP-38 vér-agy gáton való átjutása nagyon csekély, kevesebb, mint 0,1 %. Ebből következik, hogy i.p. alkalmazás után megfigyelt hatásai a meningeális erekből és a szenzoros idegvégződésekből származnak, amely a migrénnel összefüggő agyterületek másodlagos aktivációját eredményezi. Az i.p. PACAP injekció az NTG-hez hasonlóan fénykerülő magatartást és meningeális értágulatot váltott ki a vad típusú egértörzsben, azonban ezek hiányoztak vagy jelentősen kisebb mértékűek voltak a génhányos egerek esetén. További változás volt a PACAP hatására a c-Fos expresszáló TRG sejtek megemelkedett száma mindkét állatcsoportban, de a TNC-ben csak a vad törzsben jött létre fokozott neuronaktiváció 4 órával később. Az exogén peptid a PACAPerg trigeminális szenzoros neuronok perifériás végződéseit stimulja a meningeális területen, amely a sejtestek hasonló aktivációját okozza mindkét csoport TRG-jében, azonban endogén PACAP hiányában a TNC nem tud aktiválódni. Az elsődleges trigeminális érőidegek centrális végződéseiből felszabaduló PACAP elengedhetetlennek tűnik a centrális szenzitizáció mechanizmusában. Szemben az i.p. PACAP-38 hatására tapasztalt változásokkal, az i.c.v. alkalmazott PACAP nem emelte a c-Fos pozitív neuronok számát egyik csoport egyik régiójában sem. Ezért olyan kinetikai okok lehetnek felelősek, mint a gyors elimináció a gerincvelői folyadékban vagy nem megfelelő penetrációs képesség. Érdekes tapasztalatok ugyanakkor, hogy a) a vad típus mindkét régiójában jelentősen emelkedett a c-Fos expresszió az i.p. injekcióhoz képest mind a fiziológiás só, mind PACAP adása után, b) a génhányos egértörzs jelentősen csökkent c-Fos immunpozitivitása a TRG-ben mindkét injekciót követően. Az első megfigyelés magyarázatául maga a műtéti beavatkozás szolgálhat (a koponya fúrása és a kanül beültetése a mély altatás ellenére is fájdalmas stimulus), a második megfigyelést korábbi eredményeink is alátámasztják, mint a csökkent nocicepció és c-Fos expresszió a PACAP génhányos egerek fájdalom-asszociált agyi régióiban számos fájdalommodellben. Jelen eredményeink összhangban állnak azokkal a korábbi adatokkal, hogy PACAP génhányos egerekben jelentősen csökkent nocifenzív magatartást tapasztaltunk akut szomatikus és zsigeri kemonocicepció tesztekben, gyulladáso nocicepció és hiperalgézia modellekben, valamint a krónikus traumatikus mononeuropátia modelljében. A PACAP-génhányos egerek több eltérő morfológiai tulajdonsággal rendelkeznek az agy fejlődésében, ú.m. eltérő kisagyi növekedés, és kóros axonális arborizáció. Ezekon felül számos magatartásbeli eltérést megfigyeltek a PACAP génnel nem rendelkező egértörzsekben: kisebb mértékű szorongás és ugráló magatartás, csökkent depresszív viselkedés, valamint eltérő morfin-indukált jutalmazó mechanizmusok.

Jelen munkánk szolgáltatta az első állatkísérletes bizonyítékot arra, hogy a PACAP jelentős szerepet játszik a trigeminovaszkuláris aktivációban. A vér-agy gáton jól penetráló kis molekulájú, receptortípusra szelektív antagonisták szintézise és preklinikai tesztelése fontos feladat a közeljövőben.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatócsoportunk a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló neuropeptidek hatásainak komplex vizsgálatát végzi, PhD értekezésem ezen belül a szomatosztatin és a PACAP gyulladásszerű és nociceptív folyamatokban betöltött szerepének analizésére fókuszált.

**A disszertációban bemutatott legfontosabb megállapítások a következők:**

1) A szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptora fontos szerepet játszik az akut és krónikus ízületi gyulladásszerű folyamatokban. Az sst<sub>4</sub> receptor hiánya esetén az akut és a krónikus modellben is szignifikánsan nagyobb mértékű mechanikai hiperalgéziát, valamint az akut modellben szignifikánsan nagyobb lábduzzadást tapasztaltunk, elsősorban a gyulladásszerű folyamatok korábbi stádiumaiban. A krónikus artritisz modellben továbbá a gyulladt végtag terhelés-csökkenése és az ízületi homogenizátumban az IFN $\gamma$  és TNF $\alpha$  koncentrációja ugyancsak szignifikánsan nagyobb volt az sst<sub>4</sub> receptor hiánya esetén. A szelektív agonista peptidomimetikum J-2156 hatékonyan gátolta az akut gyulladásszerű mechanikai hiperalgéziát. Mindezek alapján az sst<sub>4</sub> receptor érdekes új gyulladáscsökkentő és analgetikum célpont lehet.

2) A szomatosztatin és a kortisztatin hasonló kötődési profillal és agonista tulajdonsággal rendelkezik az sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> szomatosztatin receptorokon. Ezek a peptidek jelentősen gátolják a szenzoros neuropeptid CGRP felszabadulását a perifériás szenzoros idegvégződésekből, a következményes akut plazma protein extravazációt, valamint a hő- és mechanikai hiperalgéziát. A CST és SST neurogén gyulladásra és hiperalgéziára kifejtett hasonló hatásai mellett a CST szignifikánsan nagyobb gátló hatással rendelkezik a gyulladásszerű citokintermelésre.

3) A PACAP jelentős szerepet játszik a trigeminovaszkuláris aktivációban. A PACAP hiánya egerekben szignifikánsan kisebb mértékű nitroglicerinnel kiváltott fotofóbiát, kisebb mértékű meningeális mikrocirkuláció-fokozódást, és alacsonyabb c-Fos expressziót eredményezett a TRG-ben és a TNC-ben. Az elsődleges trigeminális érzőidegek centrális végződéseiből felszabaduló PACAP kulcsfontosságú mediátor a centrális szenzitizáció mechanizmusában. Célmolekulájának azonosítása új perspektívákat nyithat a migrénellenes farmakoterápiában.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönöm témavezetőmnek, Dr. Helyes Zsuzsannának, hogy bevezetett a kutatómunka világába, mindenben támogatott, és példát mutatott szakmai tudásával, szorgalmával és fáradhatatlanságával.

Köszönöm a Neurofarmakológia Program vezetőjének, Dr. Pintér Erika Professor Asszonynak, hogy szakmai tanácsaival hozzájárult kutatómunkám eredményességéhez.

Köszönöm Dr. Szolcsányi János Professor Úrnak, hogy csatlakozhattam munkacsoportjához, és szakmai kérdéseimmel bármikor hozzá fordulhattam.

Köszönöm Dr. Barthó Loránd Professor Úrnak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy PhD-hallgatóként az intézetben dolgozhattam.

Nem lehetek elég hálás Dr. Sándor Katalinnak, aki diákkörösének fogadott, időt és energiát nem kímélve szakmai és emberi tanácsaival munkám első percétől kezdve mindvégig támogatott.

Köszönöm a kísérletek elvégzésében nyújtott nélkülözhetetlen és fáradhatatlan segítséget, valamint példamutatást Dr. Szőke Évának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Elekes Krisztiánnak és Dr. Bölskei Katának.

Köszönet illeti Perkecz Anikót kiváló minőségű szövettani munkáiért, Góglné Kati nénit, Ömböliné Dórit és Bagoly Terézt a kísérletek elvégzéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Köszönöm PhD-s társaimnak türelmüket és hasznos tanácsaikat.

Köszönet illeti Dr. Gaszner Balázst, Dr. Gasznerné Kormos Viktóriát és Dr. Szabadfi Krisztinát precíz és magas színvonalú immunhisztokémiai munkáikért.

Köszönet Dr. Reglődi Dórának, Dr. Tajti Jánosnak és Tuka Bernadettnek a sok hasznos tanácsért és iránymutatásért a kísérletek elvégzésében.

Továbbá köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának a munkám elvégzéséhez nyújtott segítséget.

Nem utolsósorban köszönöm Családomnak, hogy biztos támaszt jelentettek a hosszú évek során, és köszönöm Páromnak, hogy szeretetével és türelmével mindig mellettem állt.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi A, Keszthelyi D, Szoke E, Tóth DM, Sándor Z, Kereskai L, Pozsgai G, Allen JP, Emson PC, **Markovics A**, Szolcsányi J. (2009) Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(31):13088-93. (IF: 9,432)

**Markovics A**, Szőke E, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény A, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. (2011) Comparison of the Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-14 in Distinct In Vitro and In Vivo Model Systems. *J Mol Neurosci*. 46(1):40-50. (IF: 2,922)

**Markovics A**, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsanyi J, Pinter E, Hashimoto H, Kun J, Reglodi D, Helyes Z. (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis*. 45(1):633-44. (IF: 5,121)

### Egyéb publikációk:

Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bölskei K, Gaszner B, **Markovics A**, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z. (2010) Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides*. 44(5):363-71. (IF: 2,036)

Tuka B, Helyes Z, **Markovics A**, Bagoly T, Németh J, Márk L, Brubel R, Reglődi D, Párdutz A, Szolcsányi J, Vécsei L, Tajti J. (2012) Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system. *Peptides*. [Epub ahead of print] (IF: 2,654)

### Az értekezés alapját képező prezentációk:

**Markovics Adrienn**; A szomatostatin sst<sub>4</sub> receptor gyulladásgátló és fájdalomcsillapító szerepe akut és krónikus gyulladásmodellekben, egérben; *Biológus Doktoranduszok Konferenciája*, Pécs, 2009 (előadás)

**Markovics Adrienn**; Anti-inflammatory and analgesic roles of the somatostatin receptor subtype 4 (sst<sub>4</sub>) in acute and chronic inflammation models; *Sanofi-Aventis PhD-nap*, Budapest, 2009 (poszter)

Helyes Z, Sandor K, Elekes K, Banvolgyi A, **Markovics A**, Pinter E, Kereskai L, Szolcsanyi J; Role of somatostatin receptor subtype 4 (sst(4)) in acute and chronic inflammatory processes. *Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése Debrecen, 2008*

**Adrienn Markovics**, Katalin Sándor, Éva Szőke, Viktória Kormos, Balázs Gaszner, Dóra Reglődi, Akemichi Baba, János Tajti, László Vécsei, Bernadett Tuka, Árpád Párdutz, Annamária Fejes, Zsuzsanna Bohár, János Szolcsányi, Zsuzsanna Helyes; Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the nitroglycerin-induced migraine model of the mouse. *IBRO International Workshop, Pécs, 2010 (poszter)*

**Markovics Adrienn**, Szőke Éva, Sándor Katalin, Tuka Bernadett, Kormos Viktória, Tajti János, Szolcsányi János, Gaszner Balázs, Reglődi Dóra, Helyes Zsuzsanna; A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerepe a trigeminovaskuláris rendszerben. *A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság II. közös tudományos konferenciája, Szeged, 2010 (poszter)*

**Markovics A**, Sandor K, Kemeny A, Borzsei R, Bagoly T, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z; Cortistatin and somatostatin comparing their effects on inflammation in vitro and in vivo. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Pécs, 2010 (poszter)*

**Markovics A**, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Tuka B, Kormos V, Tajti J, Szolcsanyi J, Gaszner B, Reglodi D, Hashimoto H, Helyes Z; Role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Pécs, 2010 (poszter)*

**Markovics A.**, Szőke É., Sándor K., Elekes K., Lashgarara A., Tuka B., Kormos V., Tajti J., Szolcsányi J., Hashimoto H., Gaszner B., Helyes Zs.; Role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in the nitroglycerol-induced migraine-model of the mouse. *The 16<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology, Koppenhága, Dánia, 2010 (poszter)*

Tuka B, Helyes Z, **Markovics A**, Szoke E, Bagoly T, Reglodi D, Kormos V, Hashimoto H, Tajti J, Párdutz A, Bohar Z, Fejes A, Szolcsanyi J, Vecsei L; The role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the trigeminovascular system. *14<sup>th</sup> Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Geneva, Switzerland 2010 (poszter)*

**Markovics Adrienn**; The role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Sanofi-Aventis PhD-nap, Budapest, 2010 (előadás)*

**Markovics A**, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Tuka B, Kormos V, Tajti J, Szolcsanyi J, Gaszner B, Reglodi D, Hashimoto H, Helyes Zs; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide plays an important role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *A Magyar Idegtudományi Társaság XIII. Konferenciája, Budapest, 2011 (poszter)*

Tuka Bernadett, Helyes Zsuzsanna, **Markovics Adrienn**, Bagoly Teréz, Szolcsányi János, Tajti János, Vécsei László. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid immunoreaktivitásának (PACAP-IR) változása trigeminális aktiváció állatmodelljeiben. *A Magyar Fejfájás Társaság XVIII. Kongresszusa, Siófok, 2011 (előadás)*

Tuka B, Helyes Z, **Markovics A**, Bagoly T, Szolcsanyi J, Tajti J, Vecsei L; Alterations of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity (PACAP-LI) in rat plasma and trigeminovascular system in response to activation. *15th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS) Budapest, 2011 (poszter)*

Helyes Zs, **Markovics A**, Sándor K, Kormos V, Gaszner B, Szőke É, Botz B, Imreh A, Pintér E, Szolcsányi J, Hashimoto H, Reglődi D; A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerepének vizsgálata egér fájdalommodellekben. *FAMÉ, Pécs, 2011 (előadás)*

#### **Egyéb prezentációk:**

Elekes K, Sándor K, Szőke É, Tóth DM, Molnár FT, Szolcsányi J, **Markovics A**, Jakab L, Mester M, Szitter I, Helyes Zs; Effects of marijuana smoke on the mouse lung. *IBRO International Workshop, Pécs, 2010 (poszter)*

Szitter István, Pintér Erika, **Markovics Adrienn**, Perkecz Anikó, John Quinn, Szolcsányi János, Helyes Zsuzsanna; Tachikininék szerepének vizsgálata génhányos egerekkel dextranszulfáttal kiváltott bélgyulladás modellben. *A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság II. közös tudományos konferenciája, Szeged, 2010 (poszter)*

Helyes Zsuzsanna, Elekes Krisztián, Kemény Ágnes, Sándor Katalin, Perkecz Anikó, Kereskai László, Mester Miklós Gyula, Szakács Balázs, Jakab László, **Markovics Adrienn**, Szőke Éva, Pintér Erika, Szolcsányi János, Molnár F Tamás; Marihuana- és dohányfüst-indukálta krónikus légúti gyulladás vizsgálata prediktív egérmódelben. *A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság II. közös tudományos konferenciája*, Szeged, 2010 (előadás)

Nagy P, **Markovics A**, Perkecz A, Sandor K, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z; Role of capsaicin-sensitive sensory nerves and TRPV1 receptors in iodoacetate-induced osteoarthritis in mice. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference*, Pécs, 2010 (poszter)

Szitter I, Pinter E, Perkecz A, **Markovics A**, Elekes K, Szolcsanyi J, Quinn J, Helyes Z; The role of the tachykinin system in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference*, Pécs, 2010 (poszter)

Krisztian Elekes, K Sandor, E Szoke, DM Toth, **A Markovics**, I Szitter, L Jakab, B Szakacs, L Kereskai, J Szolcsanyi, T Molnar, Z Helyes; Peripheral effects of the marijuana smoke in the lung of mice. *The 16<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology*, Koppenhága, Dánia, 2010 (poszter)

Zs Helyes, K Elekes, K Sandor, A Kemeny, **A Markovics**, E Szoke, E Pinter, M Mester, L Kereskai, JP Quinn, PC Emson, J Szolcsanyi; Role of the transient receptor potencial vanilloid 1 (TRPV1) receptor and sensory neuropeptides in airway inflammation and hyperresponsiveness. *16<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology*, Koppenhága, Dánia, 2010 (előadás)

**A Markovics**, E Borbely, P Nagy, K Sandor, I Toth, L Kereskai, A Berger, C Paige, E Pinter, A Zimmer, J Szolcsanyi, JP Quinn, Zs Helyes; Role of tachykinins in mouse models of chronic inflammatory and degenerative joint diseases. *The Joint Meeting of Summer Neuropeptide Conference and The European Neuropeptide Club*, Boston, USA, 2011 (poszter)

**A Markovics**, E Borbely, P Nagy, K Sandor, I Toth, L Kereskai, A Berger, C Paige, E Pinter, A Zimmer, J Szolcsanyi, JP Quinn, ZsHelyes; Role of tachykinins in mouse models of chronic inflammatory and degenerative joint diseases. *FAMÉ*, Pécs, 2011 (poszter)

Borbély É, Sándor K, **Markovics A**, Pintér E, Szolcsányi J, Quinn JP, McDougall JJ, Helyes Zs; Kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéssek, TRPV1 receptorok és tachykininek szerepének vizsgálata hízósejt-triptáz indukált akut ízületi gyulladásmodellben. *FAMÉ*, Pécs, 2011 (poszter)

**A dolgozathoz kapcsolódó publikációk kumulatív impakt faktora: 17.475**

**Független citációk száma: 3**

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 22.165

Összes független citáció: 5